

SANIDAD



Cultivo de pasto limón (*Cymbopogon citratus*) (fotos: autores)

LO QUE americana

Ensayos de campo para evaluar la
efectividad de algunos
aceites esenciales

GRACIELA N. ALBO¹; ELSA CERIMELE²; MARIA S. RE²; MARISA R. DE GIUSTI³
y ADRIANA M. ALIPPI⁴

¹Curso Zootecnia AMG; ²Curso Fitoquímica; ³CIC-UNLP;

⁴CIC y Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
Universidad de la Plata. Argentina

Se realizaron diferentes ensayos de campo y de laboratorio para valorar la efectividad de los aceites esenciales procedentes de lemongrass (pasto limón), tomillo, orégano y ajedrea, en la prevención y control de las infecciones de loque americana (AFB) en colmenas pobladas con *Apis mellifera ligustica*.

Los valores de DL₅₀ para las pruebas de toxicidad aguda oral en abejas adultas se calcularon comprobando que los aceites esenciales no fueran tóxicos.

Se diseñaron dos experimentos de campo, durante dos años consecutivos, uno como curativo y el otro como preventivo. Los tratamientos se aplicaron con la alimentación tipo candi y se midió el tiempo de consumo.

La protección contra la infección por loque americana fue comparada con los resultados obtenidos usando el antibiótico tilosina (control de efectividad) y mediante controles sobre colmenas a las que se infectó con loque americana.

Asimismo, se evaluó la recurrencia de la enfermedad a lo largo de un año tras los tratamientos.

Hasta ahora los resultados de campo no son concluyentes, dado que las dosificaciones y los métodos de administración usados no han sido los adecuados para eliminar completamente las infecciones por loque americana.

Trabajo presentado como Poster en el XXXVI Congreso de Apimondia, Vancouver, Canadá.

La loque americana es la enfermedad bacteriana de las abejas más seria y está causada por la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae* subespecie *larvae*. En algunos países los antibióticos se usan generalmente como una alternativa a la quema de las colmenas infectadas, con los riesgos de contaminación de la miel y la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

Los aceites esenciales extraídos a partir de plantas aromáticas han demostrado gracias a los ensayos in vitro poseer actividad antimicrobiana (Calderone et al, 1994). Algunos de ellos se han utilizado en las colmenas para el control del pollo escayolado (Colin et al, 1989) y de la varroasis (Imdorf et al, 1994).

Los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1. Determinar la toxicidad oral aguda de los aceites esenciales sobre las abejas expresada como dosis letal media (DL_{50})
- 2. Evaluar la respuesta de las colmenas infectadas con loque americana a los aceites esenciales de tomillo, orégano, lemongrass y ajedrea.

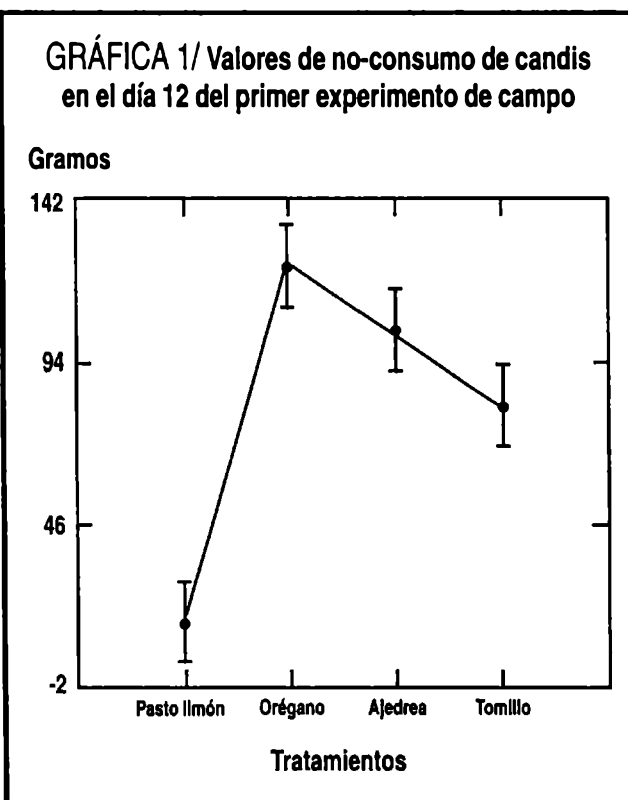
Materiales y métodos

Aceites esenciales

Se experimentó con aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), pasto limón -lemongrass- (*Cymbopogon citratus*), orégano (*Origanum vulgare*) y ajedrea (*Satureja hortensis*), obtenidos a partir de plantas cultivadas en Argentina.

Pruebas de toxicidad oral aguda en abejas adultas

Para valorar la toxicidad oral aguda de los aceites esenciales en las abejas adultas se recurrió a una prueba, aleatoria completamente, con 32 tratamientos y 10 repeticiones. Las dosis de aceites esenciales, expresadas en microgramos de ingrediente activo por abeja ($\mu\text{g i.a./abeja}$), fueron seleccionadas de acuerdo con los métodos habituales en biología con el objeto de estimar los valores de DL_{50} (Alippi et al, 1999). Se utilizó dimetoato como tóxico estándar y sacarosa como control no tóxico, preparada en forma de soluciones de propilenglicol y sacarosa en agua. Las estadísticas usadas fueron los "probit-analysis" y también los "logit-analysis" (Collett, 1981) y las correcciones de mortalidad de Abbott (ver nota 1).



sadas en microgramos de ingrediente activo por abeja ($\mu\text{g i.a./abeja}$), fueron seleccionadas de acuerdo con los métodos habituales en biología con el objeto de estimar los valores de DL_{50} (Alippi et al, 1999). Se utilizó dimetoato como tóxico estándar y sacarosa como control no tóxico, preparada en forma de soluciones de propilenglicol y sacarosa en agua. Las estadísticas usadas fueron los "probit-analysis" y también los "logit-analysis" (Collett, 1981) y las correcciones de mortalidad de Abbott (ver nota 1).

Primer experimento de campo. Tratamiento curativo

Un experimento de campo se llevó a término en la Plata (Argentina). Se utilizaron 25 colmenas de abejas italianas (*Apis mellifica ligustica* L.). Las colonias estaban formadas por unas 18.000 abejas, 5 cuadros con cría (3 con cría operculada y 2 con cría abierta), 2 cuadros con miel y polen y

3 cuadros con cera estirada. Las colmenas se distribuyeron de forma aleatoria, y en cada vértice se ubicó una colmena de bordura para disminuir el efecto de la deriva de abejas. Se efectuó el marcado y corte de alas de las reinas para evitar el enjambrado de la colonia que normalmente se produce como consecuencia de la enfermedad. Las colmenas fueron inoculadas injertando un trozo de panal de cría conteniendo 45 ± 5 escamas de loque en el cuadro central de la cámara de cría (Alippi et al, 1999). Este cuadro central (unidad experimental) fue dividido en dos áreas, una que contenía 1000 celdas (área grande) y otra, concéntrica, con 600 celdas (área pequeña).

Luego de 35 días de efectuada la inoculación, se constató el desarrollo de la enfermedad a ambos lados del marco central y en los adyacentes de los cuadros laterales. El cuadro de cría central se colocó en un canasto técnico para evitar el desove de la reina y permitir

el acceso de las nodrizas y limpiadoras, a este momento se lo consideró día 0 del experimento.

Esta situación se mantuvo durante 22 días para permitir el nacimiento de toda la cría, al cabo de los cuales se introdujo a la reina dentro del canasto técnico para obtener larvas de edad homogénea. Al cabo de 6 días de postura (9 semanas de la inoculación) se aplicaron los tratamientos, para lo que se usó 200 g de candi preparado con 40 g de miel líquida y 160 g de azúcar, a los que se añadieron los diferentes aceites esenciales en los respectivos tratamientos (5 tratamientos con 5 repeticiones):

- 1) no tratadas
- 2) 2 g de ajedrea
- 3) 1 g de pasto limón
- 4) 3 g de orégano
- 5) 1 g de tomillo

Luego de 15 días de la colocación de los candis, se efectuó la evaluación (día 43 del experimento) sobre el cuadro de cría central (unidad experimental), considerando cada lado del mismo como "unidad de observación".

Tres variables fueron analizadas por ANOVA: el número de celdas con cría sana, el número de celdas con signos de enfermedad y una relación entre ambas en cada tipo de área (grande y pequeña) y en los dos lados del cuadro (A y X). Cada candi fue pesado cada quince días para determinar el tiempo de consumo.

Segundo experimento de campo.

Tratamiento preventivo

Se utilizaron colonias originadas de paquetes, conteniendo 13.000 abejas adultas, 3 cuadros de cría y 2 cuadros de miel y polen. Las dosis de aceites esenciales utilizadas fueron:

- 1) 3,6 g de orégano
- 2) 1,2 g de tomillo
- 3) 1,8 g. de ajedrea
- 4) 1,2 g de pasto limón
- 5) control sin tratamiento

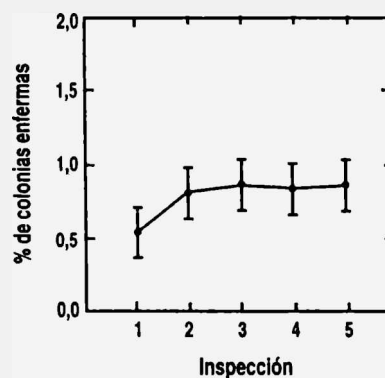
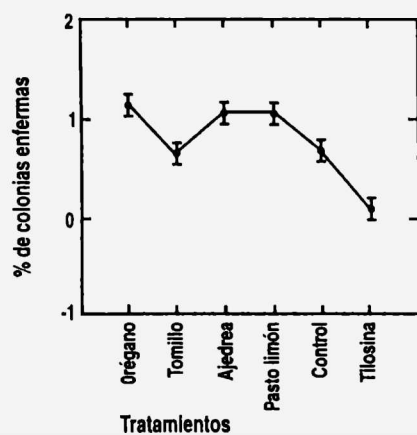
SANIDAD

Ensayos de campo

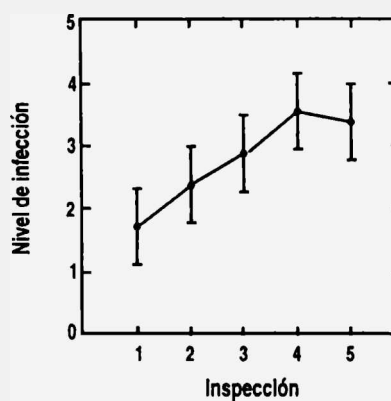
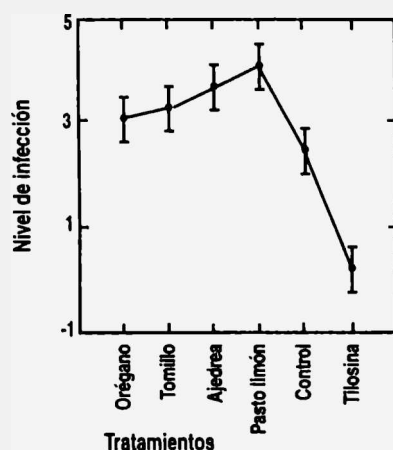
TABLA 1/ Primer experimento de campo curativo: valores del número de celdas con cría sana (huevos, larvas, pupas), número de larvas infectadas por loque americana y relación entre larvas infectadas y cría sana

	Área grande			Área pequeña		
	Síntomas de loque americana (ambos lados)	Cría sana (ambos lados del marco)	Relación entre síntomas/ cría sana	Síntomas de loque americana (ambos lados)	Cría sana (ambos lados del marco)	Relación entre síntomas/ cría sana
F	1,57	0,96	1,36	2,39	0,91	2,54
Prob.> F	0,237	0,456	0,295	0,097	0,48	0,08
Media	217,65	1575,60	0,148	138,05	1152,35	0,123
Desv. St.	154,17	459,69	0,113	89,78	256,21	0,076
Tratamientos						
Ajedrea	114,25 a*	1468,75 a	0,080 a	86,25 b	1144,25 a	0,078 b
Pasto limón	315,75 a	1290,00 a	0,218 a	211,26 b	1012,00 a	0,192 b
Orégano	241,75 a	1508,75 a	0,197 a	141,50 b	1078,00 a	0,138 b
Tomillo	278,20 a	1791,20 a	0,154 a	182,80 b	1210,00 a	0,147 b
Testigo	91,67 a	1828,67 a	0,063 a	30,33 a	1352,33 a	0,028 a

* En cada columna los valores seguidos por la misma letra no difieren entre si de forma significativa ($\alpha = 0,05$)



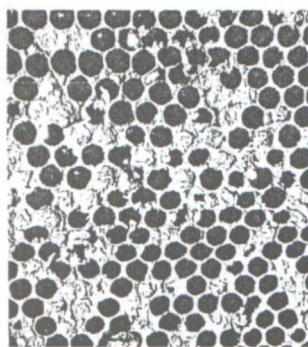
GRÁFICA 2/
Análisis de la variable porcentaje de colonias enfermas en el segundo experimento de campo



GRÁFICA 3/
Análisis de la variable nivel de infección en el segundo experimento de campo

6) 1,5 g de tartrato de tilosina como control de efectividad.

La aplicación de las dosis totales fue dividida en 6 partes, preparando candis de 70 g (55 g de azúcar + 15 g de miel líquida + la correspondiente parte de producto activo). Se hicieron 6 tratamientos (incluyendo los dos controles) con 5 repeticiones por tratamiento. El primer candi se suministró en forma "preventiva" 15 días antes de efectuar la inoculación que en este experimento se realizó con trozos de panal conteniendo 20 escamas \pm 5. Cada candi fue pesado semanalmente para calcular el tiempo de consumo y cambiado por uno nuevo cada quince días. El porcentaje de colmenas infectadas con loque en cada inspección y el nivel de infección, en porcentaje, fueron anotados y analiza-



Cuadro afectado de loque americana (foto: autores)

dos por ANOVA con un modelo lineal generalizado y sus promedios comparados con el test de Tuckey. El nivel de infestación por loque fue calculado usando los siguientes criterios:

- Signos de loque no visibles. Valor 0
- De 1 a 10 larvas infectadas. Valor 1
- De 11 a 30 larvas infectadas. Valor 2
- De 31 a 100 larvas infectadas. Valor 3
- Más de 100 larvas infectadas. Valor 4

La recurrencia de la enfermedad fue también controlada hasta un año después de finalizado el tratamiento.

Resultados y comentarios

Tests de toxicidad oral aguda en abejas adultas

Ninguno de los aceites

esenciales probados mostró toxicidad sobre las abejas. Dado que los valores de DL_{50} para 24, 48 y 72 horas, obtenidos fueron mayores de 100 μ g i.a./abeja, se comprobó que las esencias usadas eran virtualmente no tóxicas (ICBB, 1985), mientras que los valores de dimetoato fueron 0,269 μ g i.a./abeja a las 24 horas; 0,170 en 48 horas; y 0,129 en 72 horas. Estos valores de DL_{50} se encontraban dentro del rango esperado para un producto altamente tóxico (Gough et al, 1994).

Primer experimento de campo. Tratamiento curativo

Los resultados del primer experimento de campo se encuentran resumidos en la tabla 1. Se encontraron diferencias significativas entre los cuatro aceites esen-



Gilles Ratia
Consultor Apícola Internacional

✓ ¿En qué sectores trabajamos?

- Instancias gubernamentales.
- Agencias de la O. N. U. y de la Unión Europea.
- O. N. G. comprometidas en el desarrollo rural.
- Establecimientos agrícolas públicos o privados.
- Grupos de productores o particulares.
- Organismos de formación, proveedores de equipos, etc.

✓ Campos de acción

- Estudios de viabilidad, seguimientos y evaluaciones.
- Gestión integral de planes de desarrollo apícola.
- Estudios de mercado, transferencia tecnológica.
- Ayudas para la creación de cooperativas, laboratorios, mielerías, equipos de acondicionamiento, estaciones de cría (de fecundación y de inseminación).

- Creación de programas, soportes audiovisuales, informes o artículos de prensa, seminarios, cursos, etc.
- Banco de ensayos de nuevas tecnologías y nuevos materiales.
- Formación a la carta (apícola y/o informática).

✓ Actividades en Internet

- Gestión de la "Primer Galería Virtual Apícola del Mundo".
- Direcciones WEB: www.apiservices.com
- 55 empresas, asociaciones, centros de investigación y revistas han editado ya más de 1.100 páginas.
- Múltiples bases de datos: importación /exportación, museos, editores, etc.
- Creación de su propio WEB y posibilidad de estar incluido en el mayor servidor apícola internacional (más de 5.000 visitas cada mes).

APISERVICES (Grupo de Investigación y Ayuda en la Cooperación Apícola)

"Le Terrier" • F-24420 Coulaures (Francia)

Teléfono: 07 - 33 - 553 05 91 13 • Teléfono móvil: 07 - 33 - 607 68 49 39 • Fax: 07 - 33 - 553 05 44 57

E-mail: apiservices@compuserve.com • Web: <http://www.apiservices.com>

ciales y el tratamiento de control, en relación con el número de larvas infectadas con loque y también en la relación entre larvas infectadas con loque y la cría sana en el área pequeña.

Los datos demostraron que ninguno de los aceites protegió a las colmenas de la contaminación por loque en las dosis y aplicaciones utilizadas.

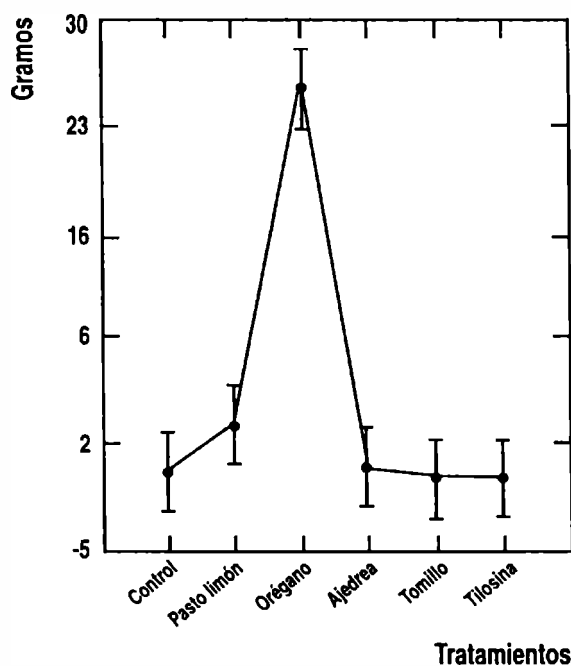
El tiempo de consumo de los diferentes aceites esenciales en el día 12 se muestra en la gráfica 1. Se hallaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los aceites, siendo el lemon-grass el más consumido y la ajedrea y el orégano las menos consumidas.

Segundo experimento de campo.

Tratamiento preventivo

En la primera inspección,

GRÁFICA 4/ Valores de no-consumo de candis en el segundo experimento de campo



las colmenas tratadas con orégano tenían un 30% de infección del nivel 1; las tratadas con tomillo, una infección del 20% en el nivel 2; y las tratadas con ajedrea y pasto limón, un 75% de infección en los niveles 3 y 4 respectivamente.

No se detectaron signos de loque en ninguna de las colmenas de control ni en los controles de tilosina. Tampoco se detectaron síntomas de loque en ninguna de las colmenas tratadas con tilosina durante los siguientes períodos de inspección (2, 3, 4 y 5), mientras que las colonias tratadas con lemon-grass, tomillo, orégano y ajedrea, así como las de control no tratadas, tuvieron altos niveles de infección por loque.

El análisis del porcentaje de colmenas enfermas mostró significativas diferencias entre los tratamientos

FORTEA



Cera estampada
Mieles
Colmenas vacías y pobladas
Material apícola

Avda. de los Pirineos, 13
 Tels.: FABRICA (974) 31 01 87 - PARTICULAR (974) 31 13 24 - FAX: (974) 31 37 14
 22300 BARBASTRO (Huesca)

($P < 0.001$), pero no diferencias significativas en función de los diferentes períodos de inspección (gráfico 2). El test de Tuckey mostró que el tratamiento con tilosina era el más efectivo ($P < 0.05$).

El análisis del nivel de infección mostró diferencias significativas debidas tanto a los tratamientos como a los períodos de inspección ($P < 0.02$). El test de Tuckey mostró de nuevo que el tratamiento con tilosina era el más efectivo (gráfico 3). Asimismo, los efectos positivos de la tilosina persistieron durante varias semanas en las condiciones de campo, como se observó al analizar la recurrencia de la enfermedad.

Los tiempos de consumo fueron similares en los diferentes períodos de inspección, y en todos los casos el orégano fue el menos consumido como se muestra en el gráfico 4.

Conclusiones

Hasta ahora los resultados de campo no son concluyentes dado que las dosis de aceites esenciales y los métodos de administración empleados eran inadecuados para eliminar las infecciones de loque completamente.

Serían de utilidad estudios ulteriores sobre los perfiles de distribución de estos aceites esenciales entre las abejas, larvas, ninfas, miel y jalea real, para comprender su farmacocinética y farmacodinámica en el interior de las colmenas. □

Agradecimientos

Esta investigación fue subsidiada por CIC, CONICET (PIA 6079) y ANPCyT (PICT 08-03857) Argentina y por la IFS de Suecia (IFS Grant No. B/1859-3F). Los autores agradecen a los grupos de Cambio Rural "El Enjambre" y "La Primavera" por la provisión de materiales para las colmenas.

Nota 1

En el caso que nos ocupa se aplica una determinada dosis de medicamento a un conjunto de abejas, los insectos presentan diferente tolerancia, cuanto mayor es la tolerancia, mayor es la dosis necesaria para que la abeja muera. Sobre una población de insectos se puede definir una cierta distribución de tolerancias, los insectos con una tolerancia menor que μ morirán cuando se les administra una dosis d_i . Asumiendo que X es una variable aleatoria asociada con una distribución de tolerancia y x es la tolerancia de un individuo en particular, $f(x)$ es la función densidad de probabilidades. La probabilidad de muerte a la exposición de una dosis d_i está dada por $p_i = P(x \leq d_i) = \int_{-\infty}^{d_i} f(x) dx$.

Si las tolerancias están normalmente distribuidas con media μ y varianza σ^2 ,

$$f(x) = (1/(\sigma\sqrt{2\pi})) \exp \{-(x-\mu)^2/\sigma^2\}, \quad -\infty < x < \infty$$

y además

$$p_i = (1/(\sigma\sqrt{2\pi})) \int_{-\infty}^{d_i} \exp \{-(x-\mu)^2/\sigma^2\} dx = \Phi((d_i-\mu)/\sigma)$$

Donde Φ es la función de distribución normal estandarizada. Si $\beta_0 = -\mu/\sigma$ y $\beta_1 = 1/\sigma$, entonces $p_i = \Phi(\beta_0 + \beta_1 d_i)$, o $\text{probit}(p_i) = \Phi^{-1}(p_i) = \beta_0 + \beta_1 d_i$.

Es habitual tomar $\text{probit}(p_i) = 5 + \Phi^{-1}(p_i)$ para de este modo evitar valores probits negativos.

Este modelo de regresión probit para las relaciones entre las probabilidades de muertos, p_i , y las dosis de insecticida, d_i , surge como resultado directo de asumir la condición de normalidad de la distribución de las tolerancias. Una distribución probabilística muy similar a la distribución normal es la distribución logística. La función densidad de probabilidades de una variable aleatoria X con distribución logística es:

$$f(x) = \exp \{(x-\mu)/\theta\} / [\theta(1 + \exp \{(x-\mu)/\theta\})^2]$$

Donde $-\infty < x < \infty$, $\theta > 0$. La media y la varianza son μ y $\pi^2\theta^2/3$ respectivamente. Si las tolerancias tienen una distribución logística entonces:

$$p_i = \int_{-\infty}^{d_i} \exp \{(x-\mu)/\theta\} / [\theta(1 + \exp \{(x-\mu)/\theta\})^2] dx$$

Escribiendo en la ecuación anterior $\beta_0 = -\mu/\theta$ y $\beta_1 = 1/\theta$, entonces:

$$p_i = \exp(\beta_0 + \beta_1 d_i) / [1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 d_i)] \quad y \quad \logit(p_i) = \beta_0 + \beta_1 d_i$$

Cuando la probabilidad de respuesta es modelizada como una función de una variable de exploración simple x , a menudo resulta de interés estimar el valor de x que corresponde a un valor especificado de la probabilidad de respuesta, en nuestros ensayos interesa conocer la dosis a la que muere el 50% de los individuos, denominada $DL50$ o dosis letal media (LD_{50} : median lethal dose). Si el modelo utilizado es el logit, previamente expuesto, esta es la dosis para la cual $p=0.5$ y dado que el $\logit(0.5)=\log 1=0$, el $DL50$ satisface la ecuación

$$\beta_0 + \beta_1 DL50 = 0 \quad y \quad DL50 = (-\beta_0/\beta_1) \quad (1)$$

Utilizando probit $\text{probit}(p_i) = \Phi^{-1}(p_i) = \beta_0 + \beta_1 d_i$

Cuando $p = 0.5$, $\text{probit}(0.5) = 0$ y el $DL50$ puede estimarse como,

$$DL50 = \exp(-\beta_0/\beta_1) \quad (2)$$

BIBLIOGRAFÍA

- ALIPPI, A. M.; ALBO, G. N.; LENIZ, D.; RIVERA, I.; ZANELLI, M. y ROCA, A. E. (1999). Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honey bees. *Journal of Apicultural Research* 38: 149-158.
- CALDERONE, N. W.; SHIMANUKI, H. y ALLEN-WARDEN, G. (1994). An in vitro evaluation of botanical compounds for the control of the honey bee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *Bacillus alvei*. *Journal of Essential Oils Research* 6: 279-287.
- COLIN, M. E.; DUCOS DE LAHITTE, J.; LARRIBAU, E. y BOUÉ, T. (1989). Activité des huiles essentielles de labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 20: 221-228.
- COLLETT, D. (1981). Modelling binary data. *Collet Chapman et Hall*. 369 pp.
- GOUGH, H. J.; MC INDOE, E. C. y LEWIS, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.). 1981-1982. *Journal of Apicultural Research* 33: 119-125.
- INTERNATIONAL COMMISSION FOR BEE BOTANY (1985). Third Symposium on the harmonization of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. Rothamsted Experimental Station, England.
- IMDORF, A.; KILCHENMANN, V.; MAQUELIN, C. & BOGDANOV, S. (1994). Optimierung der Anwendung von Apilife VAR zur Bekämpfung von Varroa jacobsoni Oud. in Bienenstöcken. *Apidologie* 25: 49-60.